

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

VÁZIZOM REGENERÁCIÓ ÉS TRANSZGENEZIS

***REGENERÁLÓDÓ VÁZIZOM JELLEMZÉSE ÉS FELHASZNÁLÁSA
TRANSZGENIKUS MODELLKÉNT***

ZÁDOR ERNŐ

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI INTÉZET

2015

dc_1047_15

I. BEVEZETŐ

A vázizomzat testünk tömegének becslés szerint mintegy 40%-át alkotja. Ez a jelentős mennyiség meglepően sokféle minőséget is takar. Elég, ha a törzs- és végtagizmok változatossága mellett az allotipikus vázizomként is emlegetett diafragmára és a szemmozgató izmokra gondolunk. A vázizom rostok posztmitotikus syncytiumok, amelyek sejtmagjai nem osztódnak, de az izom mégis képes megújulásra a rostokkal szomszédos szatellitasejtek segítségével. Ez a megújulási folyamat igen jelentős változásokkal jár: az egymagvú sejtekből (szatellitasejt, izomprekurzor sejt majd mioblaszt) többmagvúmiotubulusok, azután pedig még több sejt magvú, nagyméretű izomrostok jönnek létre. Az osztódásra képtelen, kifejlett izomrostok, bár terminálisan differenciáltak, korántsem maradnak változatlanok, hanem továbbra is alkalmazkodnak, aminek során méretük növekszik vagy csökken, tulajdonságaik eltolódnak a gyors vagy lassú irányba, azaz „transz-differenciálódnak”. Mindez a környezeti hatásokra (pl. a terhelés, beidegzés, hormonok, növekedési faktorok változása) történik. A kifejlett izom transz-differenciálódása nem csak morfológiai szempontból, hanem a folyamat molekuláris szabályozás tekintetében is eltér az izom regenerálódásától. A kifejlett izom, bár a regeneráció jellemzése során kontrollként, viszonyítási alapul szolgálhat, fejlődési szempontból csak közvetett kapcsolatban lehet a regenerálódó izommal. E kapcsolatnak áttételeit, a regeneráció egyes fázisai, melyeket részletesen kell jellemezni ahhoz, hogy megfelelő képünk legyen az izom újra kialakulásának tér- és időbeliségéről. Ez az összetett kép mutatja meg a regeneráció sajátosságait, többek között a molekuláris kutatás szempontjából alapvető tulajdonságát, hogy mennyire rendszeresek és kiszámíthatóak a benne lejátszódó

események. Ha az izomregenerálódás változásainak sorrendje viszonylag előre látható, akkor a folyamat megfelel a kísérleti rendszerként történő felhasználásnak, azaz bízni lehet abban, hogy a célirányos beavatkozás értékelhető eredményt hozhat és választ kaphatunk a kutatás által feltett kérdésre.

Ez a kérdés akár egy mesterségesen bevitt gén kifejeződése és annak hatása is lehet, hiszen több mint két évtizede ismert, hogy a vázizomrostok felveszik a „csupasz” DNS-t (plazmidokat, virális vektorokat), azaz transzfektálhatók. A szomatikus géntranszfekcióval létrehozott, úgynevezett transzgenikus vázizomnak számos előnye van a transzgenikus állathoz képest: (1) a kísérlet rövidebb időtartama, (2) a beavatkozás felnőtt állatban is elvégezhető (nincs szükség kondicionális knock-outok-ra), (3) a változtatások „vad típusú” genetikai háttérrel rendelkező állatban hozhatók létre. A technika hátránya viszont, hogy (1) a vizsgált fehérje a rendelkezésre álló vektorok többsége miatt konstitutíven overexpresszált és (2) viszonylag kevés (max:1-3%) izomrost transzfektálódik, bár ez a hatékonyság elektromos ingerléssel vagy hidrodinamikai bevitellel esetenként mintegy tízszeresére is növelhető.

II. CÉLKITŰZÉSEK ÉS KÉRDÉSFELTEVÉSEK:

Munkánk elején az izomregeneráció kevésbé ismert folyamatait kívántuk összehasonlítani a részletesebben leírt miogenezissel és izomdifferenciációval, ezért általános célokat tűztünk ki. A regeneráció általános morfológiai és hisztokémiai jellemzése után konkrétabb célok következhetnek, például egy-egy gén kifejeződésének leírása. Hiszen számítani lehetett arra, hogy a miogenezisben és az izomdifferenciálódásban

fontos gének kifejeződése dinamikusan fog változni az izomregenerációban is. A génkifejeződések tanulmányozása során is gyűjtöttünk további általános ismereteket a regenerációról. Eközben – ahogy az a tudományos kutatásban gyakran előfordul – eltértünk az eredeti tervtől, változtak a célkitűzések. A kutatómunkánk folyamatossága érdekében szerencsésnek mondható, hogy a legtöbb új célkitűzés a korábbi általános irányba illeszkedett, s így, amikor ezek teljesültek, akkor sem kellett sokat változtatnunk kísérleti rendszerünkön, ahhoz, hogy újabb kérdéseket megválaszolhassunk. Amikor már több gén kifejeződésének mintázatát is részletesen ismertük, megvizsgálhattuk hogyan történik az *in vivo* szabályozásuk és mi a funkciójuk a regeneráció folyamatában? Az izomregeneráció feltérképezése elég támpontot adott ahhoz, hogy manipulatív módszereket is alkalmazzunk, melyek hatásából következtetni lehet a folyamat belső törvényszerűségeire. A kísérletek kiszámíthatósága érdekében ilyenkor is igyekeztünk a vizsgált történéshez közeli támpontokat kiválasztani és az értelmezhetőség miatt fontosnak tartottuk, hogy az adott génkifejeződést a dinamikusan növekvő szakaszában vizsgáljuk.

Konkrét célkitűzéseink a következő csoportokba sorolhatók:

1. A génkifejeződés molekuláris vizsgálatához homogén és egyenletes izomregenerációt kívántunk előidézni, amely a kiindulási izom teljes nekrozisát követően kizárólag újonnan létrejött rostokat tartalmaz (**VI** rész, **1, 2, 3,4** közlemény).
2. Mivel a lassú és gyors típusú izomdifferenciáció eltér egymástól ezért célszerű volt a regenerációs modellt egy gyors (extensor digitorum

longus, EDL) és egy lassú típusú (soleus) izomban is kialakítani és ezeket összehasonlítani (**VI-1, 2, 3, 4**).

3. A miogenikus reguláló faktorok (MRF-k; myoD, myf-5, myogenin, MRF4) szerepe alapvető a miogenezisben és izomdifferentiálódásban. A regenerálódó izom megismétli az embrionális és neonatalis izomfejlődés állomásait, melyekben az MRF-k szerepe feltételezhető. Ezért célul tűztük ki az MRF-k kifejeződésének leírását a gyors és lassú izom regenerációjában (**VI-2**).
4. A myoD egy korai miogenikus differentiálódási faktor és szintje az izomdifferentiálódásban is dinamikusan változott. Ezért elhatároztuk, hogy felderítjük a myoD soleus izom regenerálódásában játszott szerepét antiszenz gátlás alkalmazásával (**VI-8**).
5. A túlterhelt vázizom növekszik és a növekedése feltételezhetően az izom-ín határon történik. A vázizomrost növekedéséhez új sejtmagokra van szükség, melyeket újabb mioblasztok beolvasztásával kaphat. A mioblasztok miogenikus faktorokat fejeznek ki, ezért megvizsgáltuk a miogenikus faktorok szintjét az izom túlterheltség egyik modelljében, a passzív nyújtásnak kitett soleus izom hosszában. Ugyanebben a modellben megvizsgáltuk a SERCA izoformák kifejeződési szintjét is. (**VI-5**).
6. A myostatin egy rendkívül hatásos TGF- β típusú növekedésgátló a vázizomban. Az izomregeneráció során dinamikus változások sora megy végbe, melynek során az izom eltűnik, és újra létrejön, tehát

jelentős myostatin növekedés is tapasztalható. Ezért érdekelt bennünket a myostatin szintjének változása mind a két típusú regenerációban (**VI-6**).

7. A vázizom regenerációt kiterjedt nekrosis előzi meg, amelyben kulcsszerepe van a gyulladásos folyamatoknak. Ezért megvizsgáltuk a proinflammációs citokin a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) és receptorainak kifejeződését a gyors és lassú izom regenerációja során (**VI-7**).
8. A vázizom összehúzódásában fontos szerepet játszó miozin nehézlánc izoformák kifejeződési mintázata ismert és felhasználható a regeneráció stádiumainak azonosítására. Kevésbé ismert azonban az izom elernyedésben alapvető jelentőségű szarkoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA) izoformák kifejeződése. Ezért célul tűztük ki a SERCA izoformák kifejeződésének leírását a lassú és gyors izom regenerációjában (**VI-1, 3, 4,9,10,11,12,17**).
9. A lassú izom kontrakciójáért nagymértékben felelős lassú miozin nehéz lánc (MyHC1) kifejeződése idegi szabályozás alatt áll a regenerálódó soleus izomban. A lassú SERCA2a a lassú miozinnal koordináltan fejeződik ki a regenerálódás során és a normál izomrostokban. Ezért megvizsgáltuk a lassú SERCA2a kifejeződés idegi függését a regenerálódó soleus izomban és ugyanezt megvizsgáltuk a normál izomban is (**VI-9, 14**).

- 10-11. A beidegzésnek a lassú miozin nehéz lánc kifejeződésére gyakorolt serkentő hatását két egymástól független jelút is közvetíti a regenerálódó soleus izomban. Az egyik jelút a Ras-on, a másik a kalcineurinon keresztül vezet. Ezért megvizsgáltuk a SERCA2a kifejeződés Ras- és kalcineurin-függését a regenerálódó soleusban. Ehhez a munkához a lassú miozin kifejeződés gátlásában jól bevált plazmid transzfekciót alkalmaztunk (**VI-9, 11,13**).
12. A Ras és a kalcineurin két egymástól jól elkülönülő jelút eleme a vázizomban, de a kapcsolatuk ebben a szövetben még nem ismert. A regenerálódó soleus izom transzfekciója domináns negatív Ras-sal csupán a rostok néhány százalékában sikeres, de serkenti az egész izom növekedését. Mivel a kalcineurin szerepe autokrin-parakrin folyamatokban ismert, ez felvetette a Ras és kalcineurin kapcsolatának a lehetőségét. Ezért célul tűztük a Ras és a kalcineurin összefüggésének vizsgálatát a regenerálódó soleus izomban (**VI-13**).
13. A neonatalis szarkoplazmás retikulum kalcium ATP-ázról (SERCA1b) a kifejeződési mintázata alapján feltételeztük, hogy szerepe lehet a regenerációban, s ennek kiderítésére RNS interferencia módszert alkalmaztunk a regenerálódó soleus izomban (**VI-15**).
14. Mivel a rostok kevesebb, mint 1%-ában érvényesülő jelút gátlások az egész izomra kiterjedő regenerációt serkentő hatást eredményeztek, alaposan megvizsgáltuk az izom transzfekció hatásfokát az egész regenerálódó soleusban (**VI-16**).

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinkhez 300-360g laboratóriumi patkányokat használtunk. A regenerációt a soleus ill. az extensor digitorum longus (EDL) izmokban az ausztráliai tigriskígyó tisztított méregkivonatával (hatóanyaga notexin) kiváltott nekrozissal idéztük elő. A regenerációt különböző napjain az izmokat eltávolítottuk, cseppfolyós nitrogénben hűtött izopentánban fagyasztottuk és -70 és -90 °C között tároltuk. Az izmokat fagyasztva metszettük, s a regenerációt hematoxin-eozin festés fénymikroszkópos morfológia alapján stádiumokra osztottuk. Az adaptációs izommodellek egy részét magunk fejlesztettük ki (szelektív denerváció, részleges tenotómia) másik részét (végtag denerválás, immobilizálás) a szakirodalomban leírtak alapján végeztük. A C2C12 és BC3H1 sejtkultúrát standard körülmények között differenciáltattuk

A regeneráció stádiumait morfológiai bélyegek, rostméret, hisztokémiai és immunfestési módszerekkel karakterizáltunk. A rostméret megállapítását mikroszkópi digitális kamera és számítógépes program segítségével végeztük. Az antitesteket kereskedelembe szereztek be, vagy peptid antigénnel szemben készítettük. Az in situ hibridizációt a kit gyártójának leírása alapján végeztük.

A totalis RNS-t acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform módszerrel izoláltuk izmokból és reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval (RT PCR) analizáltuk a különféle mRNS-k szintjére, melyeket a viszonylag állandó GAPDH mRNS-re normalizáltunk. Az amplifikátumokat 6%-os akrilamid gélen futtattuk és denzitometriás készüléken analizáltuk. A fragmentek radioaktív jelölés esetén az

PhosphorImager módszerrel kvantitáltuk. A mennyiségi összehasonlításokat az amplifikáció lineáris fázisában végeztük. A fragmenteket restriktációs emésztéssel és/vagy szekvenálással azonosítottuk.

A fehérje kivonatok célirányosan az adott vizsgálat számára készültek. Például a miogenikus reguláló faktorokat (MRF), a myostatint és a tumornekrózis faktor-alfát (TNF- α) sejtmag frakcióból mutattuk ki. A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-ázokat (SERCA) az egyesített mitokondrium és mikroszóma frakcióból, a miozin nehéz láncokat (MyHC) pedig, ha ugyanazon izomból izoláltuk, mint a SERCA-kat, a kivonás első üledékéből, egyébként pedig az egész izomból, speciális izolálás után mértük.

Az immunoblottokat a standard módszerekkel készítettük és a felhasznált kitek gyártói által ajánlott leírások alapján hívtuk elő. Ennél a módszernél is a detektálás lineáris fázisában végeztük a mennyiségi összehasonlításokat számítógépes denzitometriával.

Az antiszenz oligonukleotidokat társszerzőnk szintetizálta, a plazmidokat a hatásaikat publikáló külföldi laboratóriumokból kaptuk, ill. magam is készítettem. Ezeket 0,9% NaCl-ban illetve 20%-os szaharózban injektáltuk a regenerálódó izomba. A transzfektált izomrostokat a plazmidok által kifejezett Ras, hemagglutinin, GFP, myc vagy béta-galatozidáz kimutatásával azonosítottuk.

IV. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA:

1. A notexin kiváltotta teljes nekrozist követő izomregeneráció laboratóriumi patkányokban alkalmas *in vivo* modell kialakítására,

- melynek során az izom, megismételve a neonatalis izomdifferenciálódás állomásait, 28 nap alatt teljes egészében újra alakul. Ez a regeneráció szinkronitása miatt alkalmas az izomspecifikus génkifejeződés változásának tanulmányozására. A modellt gyors (extensor digitorum longus, EDL) és lassú (soleus) izomban is kipróbáltuk, ami lehetővé teszi a kétféle izomregeneráció összehasonlítását **(VI-1, 2, 3)**.
2. Megállapítottuk, hogy a differenciálódási jellemzők (az alfa-aktin mRNS szintje, a miotubulusok és a beidegzés) időbeli megjelenése alapján a notexin-nekrózis utáni lassú és a gyors izomregeneráció eltérnek egymástól; a lassú izom két-három nappal korábban mutatja a regeneráció jellemző állapotait. A differenciálódási események nagyobb szinkronitása miatt a lassú izom regeneráció alkalmasabbnak látszik a modellként történő alkalmazásra és a kísérletes manipulációra (antiszenz gátlás, transzfekció) mint a gyors izom regenerációja **(VI-1, 2, 3)**.
3. A miogenikus reguláló faktorok (MRF: myoD, myf-5, myogenin, MRF-4) mRNS szintjeiben a regenerálódó gyors és a lassú izomban jelentős változás történik. A változás folyamata különböző az egyes MRF-k esetében, de hasonló a kétféle regeneráció során. Következtetésként levonhatjuk, hogy a kétféle nekrosis-regeneráció eltérése ellenére is kiszámítható a miogenikus faktorok mRNS szintjének változása, mivel növekedésük a mioblaszt aktivációval, csökkenésük a reinnervációval esik egybe **(VI-2)**.

4. A myoD protein maximális szintje egybe esik a sejtosztódás első maximumával az izomregenerációban. A myoD szerepe igen fontos, mert a myoD antiszenz oligonukleotid viszonylag gyors, már egy óra alatt kimutatható, de négy óránál rövidebb ideig tartó gátló hatása a myoD kifejeződésre napokkal késleltette a dezmin expressziót, a miotubulusok kialakulását és az innervációt, tehát a regeneráció menetét (**VI-8**).

5. A miogenikus faktor mRNS-ek és a myoD protein szintje egyenletes eloszlású és egyenletesen növekszik passzív nyújtás hatására a soleus izom-ín határok közötti hosszában. A SERCA1a és SERCA1b transzkriptek inkább az ínhatárok közelében találhatók. A SERCA1a mRNS eloszlása passzív nyújtásra nem változik, de a neonatalis SERCA1b mRNS-ből még több lesz az ínhatárok közelében, de ez nem jár együtt a SERCA1b protein szint emelkedésével. (**VI-5, 12**).

6. A myostatin, mint az izom növekedés gátló faktora, kis mennyiségben található meg a normál izomban, de az izomnekrózis alatt a szintje rendkívül megnő, majd később, az izomregeneráció tényleges szakaszában lecsökken. Ebben a tekintetben a lassú és gyors izom nem mutat más különbséget azon kívül, mint ami a kétféle regeneráció szinkronitása és időbeli lefolyása alapján várható. A myostatin mRNS szint azonban mind a kétféle regenerációban lényegében a protein szintjével ellentétesen változik, azaz nekrózisban alacsony és a regenerációban megnő. Mindez a myostatin kifejeződés protein szintű szabályozására utal a regenerálódó vázizomban (**VI-6**).

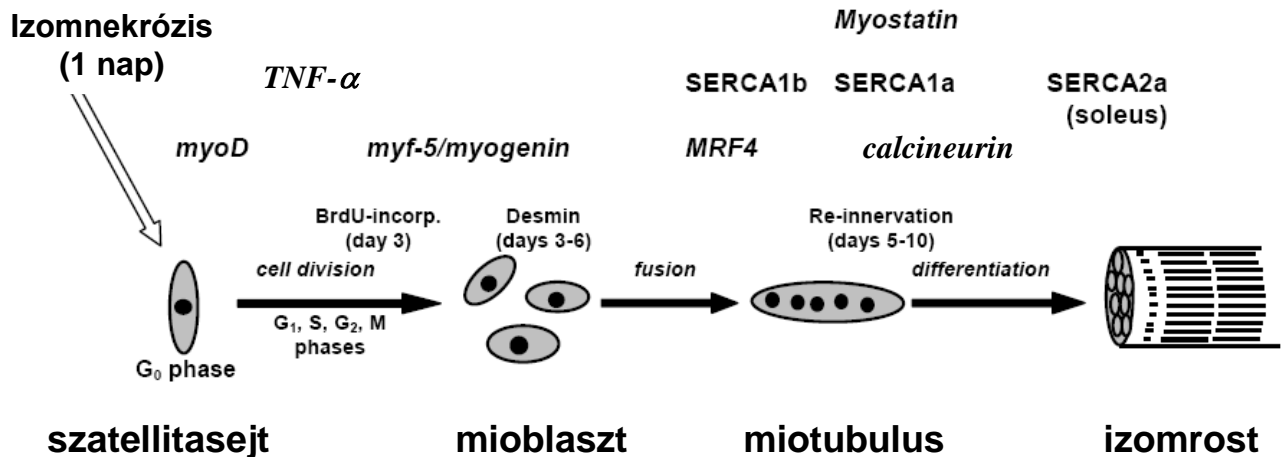
7. A TNF- α mRNS és fehérje szintje hasonló módon változik izom regenerációban: a nekrosis ideje alatt rendkívül megnő és a miotubulusok megjelenése után pedig a normálhoz közeli értékre csökken. Hasonlóan változik a TNF receptorok mRNS szintje is. Ezek a változások kevésbé szinkronizáltak a gyors EDL izom regenerációja során, mint a lassú soleus izomében. A TNF- α mRNS nem mutatható ki a differenciálódó mioblaszt kultúrában. A regenerálódó izomban a dezminre pozitív sejtek és miotubulusok sem fejezik ki a citokint és annak szintje a makrofág/limfocita specifikus MAC-387 antigénnel korrelál. Ezért valószínű, hogy a regenerálódó izomban is a makrofágok fejezik ki a TNF- α -t (VI-7).
8. A szarkoplazmás/endoplazmás retikulum Ca^{2+} -adenozin trifoszfatazok (SERCA) izoformáinak változása az izom regenerálódás során megismétli a neonatális fejlődés állomásait. Az SERCA formák fehérje szintje követi a transzkript szint változásait az izomregenerációban. A SERCA-k megjelenési sorrendje a gyors és lassú izom regenerációban is neonatális izoformával kezdődik, majd az izom jellegével ellentétes izoformával folytatódik, végül az izomra jellemző izotípus dominál. A SERCA-k általában koordináltan fejeződnek ki a miozin nehézlánc izoformákkal a lassú típusú izom regenerációja során és a regenerálódott izomrostokban, de a lassú típusú SERCA2a kifejeződése az innerváció alatt kevésbé növekszik, mint a lassú mioziné. A lassú miozin és a lassú SERCA kifejeződése gyakran tér el egymástól a részlegesen tenotomizált notexin-nekrosis után regenerálódó soleus izom rostjaiban is (VI-1, 3, 4, 9, 10, 11, 12).

9. A SERCA2a kifejeződése a lassú miozinnal ellentétben nem függ direkt módon a beidegzésről az izomregeneráció során. Hasonlót tapasztaltunk a nem regenerálódó (normál) denervált soleus izomban is, ahol a SERCA2a kifejeződés növekszik, míg a lassú miozin drámaian csökken (**VI-9, 14**).
10. Az innervált regenerálódó soleus izom domináns negatív Ras-t kifejező plazmida történt transzfekciója nem befolyásolta SERCA2a kifejeződést, ellentétben a lassú miozin kifejeződésével, amelyet meggátolt. A denervált regenerálódó soleusban a MAPK útvonalat serkentő Ras indukálja a lassú miozin kifejeződését, de a SERCA2a kifejeződése ettől nem változik. Tehát a SERCA2a kifejeződése a regenerálódó lassú izomban nem függ közvetlenül a Ras-tól, ellentétben a lassú miozinnal, amely Ras függő (**VI-9**).
11. A regenerálódó soleus izom kalcineurin gátló cain peptidet kifejező plazmida történt transzfekciója során a lassú miozin kifejeződés gátolt, de a SERCA2a kifejeződés nem változik. Tehát a SERCA2a kifejeződése nem függ közvetlenül a kalcineurintól a regenerálódó soleus izom rostjaiban (**VI-11**).
12. A lassú izom differenciálódás két kulcsfontosságú jelátviteli útja, Ras és a kalcineurin út között lehetséges a kapcsolat. A regenerálódó soleus izom mindössze 10-30 izomrostjának transzfekciója domináns negatív Ras-sal stimulálja a növekedést az egész (mintegy 2500 rostot tartalmazó) izomban. A dnRas transzfektálása nem eredményez

méretnövekedést (hipertrófiát) a regenerálódás végén, csak serkenti a kifejezett méret elérését. A dnRas stimuláló hatása elmarad a calcineurin gátló cain-nal történt együttes transzfektálás vagy interleukin-4 antitest izom környéki injektálása esetén. Mindez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy a Ras gátlása stimulálja a calcineurin aktivitását, mely az NFAT sejtmagba juttatásával indukálja az IL-4 termelődését, s ezzel autokrin-parakrin módon elindítja a rostok növekedésének serkentését (**VI-13**).

13.A SERCA1b kifejeződés csendesítése mindössze néhány izomrostban, a Ras gátláshoz hasonlóan, az egész regenerálódó izomra kiterjedő növekedésserkentő hatást eredményezett. Ennek a (nyilvánvalóan autokrin-parakrin módon megvalósuló) növekedésserkentésnek is előfeltétele, hogy aktív legyen a calcineurin-NFAT-IL4 jelút a SERCA1b csendesített izomrostokban (**VI-15, 17**).

14.A transzfekció hatásfokának vizsgálata a regenerálódó izomban kimutatta, hogy a pozitív rostokban kevesebb izomsejtmag fejezte ki a transzgént, mint az az injektálás helyén becsülni lehetett. Ez méginkább hangsúlyozta a regenerációban kiváltott növekedés serkentő hatás autokrin-parakrin jellegét (**VI-16**).



1. Ábra: Az izomregenerációban vizsgált génkifejeződések vázlatos összefoglalása. A nevek az MRF, SERCA, myostatin, TNF- α , calcineurin mRNS-k/fehérjék feltűnésének idejét mutatják a regeneráció jellegzetes morfológiai változásaival egy időben. A soleus és EDL regeneráció között jellemző különbség, hogy a SERCA2a csak a soleusban marad domináns izoforma a regeneráció végére, míg az EDL-ben a SERCA1a lesz a tipikus SR pumpa.

V. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Eredményeink elsősorban alapkutatási jellegűek, ezért az alkalmazásukra közvetlenül valószínűleg nem kerülhet sor. A génkifejeződések és ezek szabályozásának leírása azonban fontos információkkal szolgál klinikai gyakorlat elméleti háttéréhez. Különösen igaz ez az 5-ös pontban szereplő passzív nyújtás és passzív mozgatásra illetve arra az autokrin-parakrin szabályozási mechanizmusra, amely néhány rost részleges transzfekciója által az egész izom regenerációját serkenti. A módszer egy újfajta szomatikus génterápia lehetőségét veti fel a degeneratív-regeneratív izomdisztrófiák és az izomsérülések gyógyításában. Az erre vonatkozó szabadalmi igényt bejelentettük.

VI. Az értekezéshez tartozó, a kandidátusi fokozat megszerzése óta megjelent folyóiratcikkek, impakt faktoraik (a megjelenés évében) valamint független idézeteik

1. **Zádor E**, Mendler L, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F (1996) Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J* **320**: 107-113
IF: 3.687 25 idézet
2. Mendler L, **Zádor E**, Dux L and Wuytack F (1998) mRNA levels of myogenic regulatory factors in rat slow and fast muscles regenerating from notexin-induced necrosis. *Neuromusc Disorders* **8**: 533-541
IF: 2.582 26 idézet
3. Mendler L*, Szakonyi G*, **Zádor E***, Görbe A, Dux L and Wuytack F (1998) Expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases in the rat extensor digitorum longus (EDL) muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *J Muscle Res Cell Mot* **19**: 777-785 *Azonos mértékben közreműködő szerzők
IF: 2.905 5 idézet
4. **Zádor E**, Szakonyi G, Rácz G, Mendler L, Ver Heyen M, Lebacq J, Dux L and Wuytack F (1998) Expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase protein isoforms during regeneration from notexin induced necrosis of rat muscle. *Acta Histochem* **100**: 355-369
IF: 0.878 8 idézet
5. **Zádor E**, Dux L and Wuytack F (1999) Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *J Muscle Res Cell Mot* **20**: 395-402
IF: 2.214 20 idézet
6. Mendler L, **Zádor E**, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F (2000) Myostatin in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J Muscle Res Cell Mot* **21**: 551-563
IF: 2.117 40 idézet

7. **Zádor E**, Mendler L, Takács V, De Bleecker J and Wuytack F (2001) Regenerating soleus and EDL muscles of the rat show elevated levels of TNF- α and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80. *Muscle Nerve* **24**: 1058-1067
IF: 2.316 35 idézet

8. **Zádor E**, Bottka S and Wuytack F (2002) Antisense inhibition of myoD expression in regenerating rat soleus muscle is followed by an increase in the mRNA levels of myoD, myf-5 and myogenin and by a retarded regeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1590**: 52-63
IF: 3.016 12 idézet

9. **Zádor E** and Wuytack F (2003) Expression of SERCA2a is independent of innervation in regenerating soleus muscle. *Am J Physiol -Cell Physiol* **285**: C853-C861
IF: 4,103 8 idézet

10. Fenyvesi R, Rácz G, Wuytack F and **Zádor E** (2004) The calcineurin activity and MCIP1.4 mRNA levels are increased by innervation in regenerating soleus muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 599-605
IF: 2,904 14 idézet

11. **Zádor E**, Fenyvesi R and Wuytack F (2005) Expression of SERCA2a is not regulated by calcineurin or upon mechanical unloading in skeletal muscle regeneration. *FEBS Letters* **579**: 749-752
IF: 3.415 6 idézet

12. **Zádor E**, Vangheluwe P and Wuytack F. (2007) The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell Calcium* **41**: 379-88
IF: 4.338 5 idézet

13. **Zádor E** (2008) dnRas stimulates autocrine-paracrine growth of regenerating muscle via calcineurin-NFAT-IL-4 pathway. *Biochem Biophys Res Com* **375**: 265-70
IF: 2.648 2 idézet

14. Szabó A, Wuytack F and **Zádor E** (2008) The Effect of Passive Movement on Denervated Soleus Highlights a Differential Nerve Control on SERCA and MyHC Isoforms. *J Histochem Cytochem.* **56**: 1013-22

IF: 2,823

2 idézet

15. **Zádor E**, Owsianik G, Wuytack F (2011) Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. *Histochem Cell Biol* **135**:11-20.

IF: 2,588

2 idézet

16. Kósa M and **Zádor E** (2013) Transfection efficiency along the regenerating soleus muscle of the rat. *Mol Biotechnol* **54**:220-7.

IF: 2,275

0 idézet

17. **Zádor E**, Kósa M. (2015) The neonatal sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA1b): a neglected pump in scope. *Pflügers Arch* **467**:1395-401. (invited review)

IF:3,073 (2013)

0 idézet

VII. Az értekezéshez nem használt, a kandidátusi fokozat megszerzése óta megjelent folyóiratcikkek, impakt faktoraik (a megjelenés éve/2007) és a független idézeteik.

1. **Zádor E.** and D. Budai (1994) Expression of the acetylcholinesterase gene during development of Drosophila embryos. *Neurobiology* **2**: 301-309

IF: 0

5 idézet

2. **Zádor E.** (1995) Expression of the acetylcholinesterase transcript in the chordotonal neurons of Drosophila embryos. *Biochem Genet* **33**: 41-49

IF: 0.875

1 idézet

3. Szakács R, Weiczner R, Mihály A, Krisztin-Péva B, Zádor Z and **Zádor E** (2003) Non-competitív NMDA receptor antagonists moderate seizure-

induced c-fos expression in the rat cerebral cortex. *Brain Res Bulletin* **59**: 485-493

IF: 2,609

13 idézet

4. Rácz GZ, Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Cadot P, De Paepe K, **Zádor E**, Wuytack F and Decramer M (2003) Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* **168**: 297-304

IF: 8,876

27 idézet

5. Kiss G, **Zádor E**, Szalay J, Somogyi F and Vér A (2004) Molecular forms of acetylcholinesterase in rat extensor digitorum longus and soleus muscles regenerating from notexin induced necrosis. *J Muscle Res Cell Motil* **25**: 509-514

IF: 1.721

0 idézet

6. Mihály A, Borbély S, Világi I, Détári L, Weiczner R, Zádor Z, Krisztin-Péva B, Bagosi A, Kopniczky Z and **Zádor E** (2005) Neocortical c-fos mRNA transcription in repeated, brief, acute seizures: Is c-fos a coincidence detector? *Int J Mol Med* **15**: 481-6

IF: 2.09

1 idézet

7. Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Maes K, Rácz GZ, Cadot P, **Zádor E**, Wuytack F, Decramer M (2005) Intermittent spontaneous breathing protects the rat diaphragm from mechanical ventilation effects. *Crit Care Med.* **33**:2804-9.

IF:5,077

53 idézet

8. Vangheluwe P, Schuermans M, **Zádor E**, Waelkens E, Raeymaekers L, Wuytack F. (2005) Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. *Biochem J.* **389**:151-9

IF:4,224

55 idézet

9. Tóth N, Szabó A, Kacsala P, Héger J and **Zádor E** (2008) 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* **15**: 691-8

IF: 2,330

23 idézet

10. Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki Á and **Zádor E** (2008) Phytoecdysteroids and Anabolic-Androgenic Steroids - Structure and Effects on Humans. *Current Medicinal Chemistry* **15**: 75-91 (review)

IF:4,823

40 idézet

11. Rácz G, Szabó A, Vér A, **Zádor E**. (2009) The slow sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase declines independently of slow myosin in soleus muscle of diabetic rats. *Acta Biochim Pol* **56**: 487-93

IF:1,262

6 idézet

12. Tóth N, Hunyadi A, Báthori M, **Zádor E**. (2010) Phytoecdysteroids and vitamin D analogues--similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem.***17**:1974-94. (review)

IF:4,630

5 idézet

13. Guglielmi V, Vattermi G, Gualandi F, Voermans NC, Marini M, Scotton C, Pegoraro E, Oosterhof A, Kósa M, **Zádor E**, Valente EM, De Grandis D, Neri M, Codemo V, Novelli A, van Kuppevelt TH, Dallapiccola B, van Engelen BG, Ferlini A, Tomelleri G. (2013) SERCA1 protein expression in muscle of patients with Brody disease and Brody syndrome and in cultured human muscle fibers. *Mol Genet Metab.* **110**:162-9

IF:2,827

2 idézet

14. Baán JA, Kocsis T, Keller-Pintér A, Müller G, **Zádor E**, Dux L, Mendler L (2013) The compact mutation of myostatin causes a glycolytic shift in the phenotype of fast skeletal muscles. *J Histochem Cytochem* **61**:889-900

IF:2,403

1 idézet

15. Kósa M, Brinyiczki K, van Damme P, Goemans N, Hancsák K, Mendler L, **Zádor E** (2015) The neonatal sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gives a clue to development and pathology in human muscles. *J Muscle Res Cell Motil* **36**:195-203

IF:1,934

0 idézet

16. Tóth A, Fodor J, Vincze J, Oláh T, Juhász T, Zákány R, Csernoch L, **Zádor E** (2015) The Effect of SERCA1b Silencing on the Differentiation

dc_1047_15

and Calcium Homeostasis of C2C12 Skeletal Muscle Cells. *PLoS One*.
20;10:e0123583

IF:3,534

0 idézet

<u>Megjelent folyóiratcikk:</u>	<u>Impakt faktor</u>	<u>Független idézet</u>
Összes munkásság:38	107,9	511
Kandidátusi után: 33	97,073	447
Értekezéshez használt: 17	47,882	209

Köszönetnyilvánítás

Kutatómunkám során sokan mutattak érdeklődést elgondolásaim iránt és jó néhányan segítettek a kísérletek kivitelezésében és a közlemények elkészítésében. Közülük dr. Mendler Luca, Dr. Rácz Gábor, Dr. Szabó A. Zsófia és Dr. Kósa Magdolna PhD hallgatóként kapcsolódtak be a munkába, együttműködésüket köszönöm. Frank Wuytack professzornak, a Leuveni Katolikus Egyetem Ca^{2+} transzport ATP-áz laboratórium vezetőjének a téma kezdetétől számított tizennégy évig tartó együttműködésért jár köszönet. Ez az együttműködés Dr. Dux László intézetvezető professzor támogatásával alakult ki. A társszerzősége túl szeretnék köszönetet mondani prof. Peter Vangheluwe-nak és a néhai Dr. Bottka Sándornak. Prof. Ghislaine Gayan-Ramirez-nek és prof. Marc Decramer-nek azért, hogy lelkesen alkalmazták a légzőizom kutatásban a regenerációban szerzett tapasztalatainkat. Dr. Kiss Gábornak, Dr. Vér Ágotának a regenerációhoz kapcsolódó témában, prof. Báthori Máriának és Dr. Tóth Noéminek az ekdiszteroid hatáshoz kapcsolódó együttműködésért szeretnék köszönetet mondani. Dr. Fodor Jánosnak prof. Csernoch László izomkutató csoportjából azért, hogy velük alkalmam nyílt folytatni a SERCA1b kutatást. Feleségem és családom türelme és támogatása mindig ott volt a háttérben.